

THESIS

MUNICH

1961

VERGLEICHENDE AUTORADIOGRAPHISCHE
UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG
VON CARCINOGENEN,
ZIGARETTENRAUCHKONDENSATEN
UND LÖSUNGSMITTELN
AUF DIE MÄUSEHAUT

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF. 94304

Wolfgang Féaux de Lacroix



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154008_0062

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. W. Büngeler

VERGLEICHENDE AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE WIRKUNG VON
CARCINOGENEN, ZIGARETTENRAUCHKONDENSATEN
UND LÖSUNGSMITTELN AUF DIE MÄUSEHAUT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Féaux de Lacroix
aus Hamburg

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Dontenwill

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Büngeler

Dekan: Prof. Dr. M. Kiese

Tag der mündlichen Prüfung: 11.7.1967

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. GESCHICHTLICHER ABRISS	
1. Erste Veröffentlichungen	1
2. Retrospektive Untersuchungen	1
3. Prospektive Untersuchungen	2
4. Tierexperimente	3
II. CHEMISCHE ANALYSE DES TABAKRAUCHS	
1. Zusammensetzung des Tabakrauchs	3
2. Aromatische Kohlenwasserstoffe	3
3. Pyrolyse	4
III. LANGZEITTESTE	4
1. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen	5
IV. KURZZEITTESTE	5
A) Talgdrüzenschwundtest	6
B) Carcinogene und Zellkulturen	6
C) Mutagene Wirkung der Carcinogene	7
D) Molchtest	7
E) Autoradiographie	7
V. MATERIAL UND METHODIK	9
VI. ZUR METHODIK	
1. Begründung der 7 Tage langen Pause zwischen Rasur und Versuchsbeginn	11
2. Interfollikuläre Zählung	12
3. Mäusestamm	12
4. Alter	12
5. Geschlechtsabhängigkeit	13
6. Haarwuchszyklus	13
7. Lichteffect	14
8. Tageszeitunterschiede	14
9. Tötungszeit	15
10. Lösungsmittel	15

11. Autoradiographie	
a) Thymidin	15
b) H^3 Thymidin	16
c) Verfügbarkeit des Thymidins	16
d) Markierung durch andere Elemente	16
e) Markierungsindex	17
VII. VERSUCHSERGEBNISSE	18
Tabelle 1	19
Tabelle 2	20
VIII. DISKUSSION	
Lösungsmittelleffekt	21
Verhalten eines reinen Carcinogens	21
Veränderung des Markierungsindex durch Carcinogene und Cocarcinogene	22
DMBA: Zeit-Wirkungsbeziehung	22
DMBA: Dosis-Wirkungsbeziehung	23
Vergleich mit EVENSENS Crotonöl-Untersuchungen	24
IX. ZUSAMMENFASSUNG	24
X. KURVEN	27-27b
XI. LITERATURVERZEICHNIS	28

I. GESCHICHTLICHER ABRISS

1. Erste Veröffentlichungen

Johann Jakob HOLLAND (127) scheint der erste zu sein, der das Auftreten von Carcinomen dem Rauchen zuschreibt. 1739 veröffentlichte er eine Arbeit, in der er die aus den Pfeifenstielen fließende Tabaksbeize als auslösendes Moment ansieht. SÖMMERING (127) vertritt 1795 dieselbe Hypothese. Erst nach über 100 Jahren wurden diese ausgezeichneten klinischen Beobachtungen wiederaufgegriffen und der erste tierexperimentelle Versuch unternommen. BROSCHE (16) pinselte 1900 Meerschweinchen mit verschiedenen Stoffen, darunter Teer, Ruß und Tabaksaft. Leider hat er nicht angegeben, wie der Tabaksaft gewonnen und mit welcher Konzentration und wie lange die Tiere behandelt wurden.

Wenn man den Weg der Forschung auf dem Gebiet des Tabakrauchens weiter verfolgt, so lassen sich die Arbeiten in zwei Richtungen gliedern: die klinische Statistik und die Tierexperimente. Die klinische Statistik ist entweder retrospektiv oder prospektiv angelegt worden.

2. Retrospektive Untersuchungen

Die meisten der bisherigen Arbeiten über die pathogenetische Bedeutung des Zigarettenrauches gehen retrospektiv vor. D.h. sie befragen erst nach Manifestwerden der Erkrankung, z.B. des Bronchialcarcinoms, die Patienten wegen ihrer Rauchgewohnheiten. So kann leicht durch die größere Intensität der Befragung ein falsches Bild entstehen. Es kann dem Patienten suggeriert werden, er habe viel oder wenig geraucht, je nach der Einstellung und den Wünschen des Untersuchers, der die Verbindung von Rauchen und Bronchialcarcinom beweisen oder bestreiten will. Diese mögliche Suggestibilität wird dadurch begünstigt, daß die Statistik auf dem Gedächtnis des Einzelnen basiert. Obgleich dieser Methode also viele Mängel anhaften, die lebhaften Widerspruch hervorriefen, kann man doch ihre erstaunlichen Ergebnisse nicht von der Hand weisen. DOLL et al. (32,33) fanden z.B.,

daß unter 1465 an Bronchialcarcinom Erkrankten nur 0,5% Nichtraucher waren. WYNDER und GRAHAM (137) fanden, daß unter den beobachteten Bronchialcarcinomkranken 51,2% excessiv schwere Raucher bzw. Kettenraucher sind, im allgemeinen Krankengut ohne Bronchialcarcinom aber nur 19,1%.

3. Prospektive Untersuchungen

Eine prospektive Untersuchung über den Zusammenhang zwischen Zigarettenrauchen und Bronchialcarcinom ist von HAMMOND et al. (54,55,56) an 187766 Männern vorgenommen worden. Durch 20000 Helfer wurden die Versuchspersonen untersucht und über ihre Rauchgewohnheiten befragt. Die Männer wurden über einen Zeitraum von 44 Monaten beobachtet. Die Gesamtsterblichkeit war bei Rauchern um 68% höher als bei Nichtrauchern. Wurden zwei oder mehr Packungen täglich geraucht, so erhöhte sich die Todesrate auf 123%. Nach den Ursachen aufgeschlüsselt, fanden die Autoren 53,1% der Todesfälle durch Coronarerkrankung, 13,5% durch Lungencarcinom und 13,5% durch Carcinome anderer Lokalisation. Diese Ergebnisse zeigen deutlich die höhere Sterblichkeit der Raucher und die ätiologische Beziehung des Rauchens zum Bronchialcarcinom. Sie sind verlässlicher als retrospektive Untersuchungen, weil das Patientengut nicht vom Ergebnis - dem Bronchialcarcinom - ausgehend ausgewählt wird. Die Lebensumstände und Rauchgewohnheiten der Untersuchten können von ihnen selbst erfahren werden und nicht aus einer Krankengeschichte, die in dieser Beziehung ungenau sein kann. Es lassen sich auch vergleichbare Gruppen aufstellen, die sich voneinander nur im Rauchen bzw. Nichtrauchen unterscheiden.

Diesen Untersuchungen ist entgegengehalten worden, daß die Auswahl der Versuchspersonen nicht zufällig und deswegen nicht repräsentativ sei. Es bestände die Möglichkeit, daß eine erbliche Disposition gleichzeitig zu Bronchialcarcinom und Rauchen bestände. Dem hält WYNDER (139) nach seinen Untersuchungen an Seventh Day Adventisten, die weder rauchen noch trinken, entgegen, daß sich wohl kaum die

Neigung des Nichtraucher, der Beitritt zu dieser Sekte und das geringere Auftreten des Bronchialcarcinoms gleichzeitig vererben.

4. Tierexperimente

Zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen haben sich mit der Frage der carcinogenen Wirkung des Zigarettenrauches beschäftigt (101,128,129,132,133,138).

Unter Berücksichtigung der im Tierexperiment angewandten Dosis kann nach DRUCKREY (37) das Zigarettenrauchkondensat als schwaches Cancerogen angesehen werden. Während durch Rauchkondensat allein Tumoren der Haut und der Lunge erzeugt werden konnten, gelang es im Tierexperiment durch Rauchinhalation nicht eindeutig, Lungentumoren hervorzurufen.

II. CHEMISCHE ANALYSE DES TABAKRAUCHS

1. Zusammensetzung des Tabakrauchs

Der Tabakrauch (76) besteht aus einer Gas- und einer Partikelphase. In dem gasförmigen Anteil ließen sich unter anderem CO, CO₂, NO₂, O₂ nachweisen. Die meisten Untersuchungen konzentrierten sich aber auf die Auftrennung und Klärung der Zusammensetzung der Aerosol- oder Partikelphase (39,100). Bis heute sind schon etwa 800 Stoffe (107, 123) im Kondensat nachgewiesen worden. Es handelt sich um mehrere große Stoffgruppen: Aldehyde, Ketone, Säuren, Alkohol, Alkaloide, andere Stickstoffverbindungen, Kohlenwasserstoffe, Amine, Aminosäuren und anorganische Verbindungen. Unter diesen Gruppen sind u.a. die aromatischen polycyclischen Kohlenwasserstoffe als Carcinogene anzusehen.

2. Aromatische Kohlenwasserstoffe

Im Zigarettenrauch wurde von mehreren Untersuchern 3,4 Benzpyren und 1,2,3,4-Dibenzanthracen nachgewiesen (22, 48,102,133,134,135), deren carcinogene Eigenschaft schon

länger bekannt war. Diese zwei Substanzen und weitere Stoffe aus der Gruppe der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe spielen eine große Rolle als Initiatorstoffe, doch erklärt nach DRUCKREY (37) der Gehalt dieser Kohlenwasserstoffe im Rauchkondensat nur etwa 1% seiner Wirkung. Es müssen also noch andere Stoffe, wie z.B. Cocarcinogene, wirksam werden.

3. Pyrolyse

Verschiedene Versuche zeigen, daß die Carcinogene erst beim Rauchen der Zigaretten bzw. der Zigarren entstehen. LETTRE und JAHN (75) fanden mit Hilfe des Ultraviolettsspektrums polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe im Extrakt aus Zigarrenstummeln, aber nicht in ungerauchten Zigarren. Daraus geht hervor, daß die polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe erst durch die Erhitzung entstehen. Schon 1925 untersuchte KENNAWAY (63) Substanzen, die durch Erhitzen auf 700° - 920° aus so unterschiedlichen Stoffen wie Acetylen, Isopren, Hefe und menschlicher Haut gewonnen wurden und im Tierversuch Carcinome erzeugten. Das zeigt, daß nicht die Ausgangsstoffe, sondern die vollständige Verbrennung für die Bildung der Cancerogene maßgebend sind. WYNDER et al. (141) fanden, daß die Höhe der Verbrennungstemperatur einen deutlichen Einfluß auf die Ausbeute an Cancerogenen im Kohleteer hat. Lag die Temperatur unter 450° , so war die Wirkung gering. Bei 560° und höheren Temperaturen steigert sich die Menge der Carcinogenausbeute sehr stark.

III. LANGZEITTESTE

Wie wir gesehen haben, besteht der Tabakrauch aus einer großen Anzahl von Stoffen, die bisher nur teilweise identifiziert wurden. Es ist wichtig zu wissen, welchen Stoffen cancerogene Aktivität zukommt, um sie eventuell eliminieren zu können. Dazu reicht aber die chemische Analyse nicht aus, wenn man von den Verbindungen absieht, deren Cancero-

genität schon früher nachgewiesen wurde. Hierüber gibt nur der Tierversuch Aufschluß.

Nur die Langzeitteste sind in ihren Ergebnissen spezifisch, da allein der Nachweis von Papillomen und Carcinomen eine carcinogene Wirkung beweist. Als Nachteil des Langzeittestes muß die lange Versuchsdauer angesehen werden. Es dauert meist anderthalb bis zwei Jahre, bis sich Papillome und Carcinome entwickeln.

Die Aussagekraft des Langzeitversuches ist von der Anzahl der verwandten Tiere abhängig. Gerade wenn die Tumorausbeute bei verschiedenen Versuchsgruppen nur wenig differiert, kann ein signifikanter Unterschied nur bei großen Tierzahlen erzielt werden.

1. Übertragbarkeit der Langzeitteste auf den Menschen

Für einzelne Tierstämme sowie für verschiedene Tierarten (27,57) ist eine unterschiedliche Reaktion auf Carcinogene nachgewiesen worden. Man muß daher in der Übertragung der Ergebnisse der Langzeitversuche auf den Menschen sehr vorsichtig sein.

Ein weiterer Unsicherheitsfaktor ist der unterschiedliche Applikationsort des Tabakrauchs beim Menschen und beim Tier. Beim Menschen wirkt der Rauch auf den Respirationstrakt, der von unverhorntem Plattenepithel und Flimmerepithel ausgekleidet ist. Da es bisher nicht gelang, im Respirationstrakt der Tiere durch Rauchinhalation Carcinome hervorzurufen, wird bei den meisten Tierversuchen, wie auch bei unseren Versuchen, die Haut mit ihrem verhornten Plattenepithel mit Rauchkondensat gepinselt. Diese Behandlung der Haut mit Rauchkondensat ist mit den normalen Raucheinwirkungen beim Menschen nur bedingt vergleichbar (129).

IV. KURZZEITTESTE

Die oben angeführten Nachteile der Langzeitteste, darunter insbesondere der Zeitfaktor, regten die Suche nach

geeigneten Kurzzeittesten an. Über die Vor- und Nachteile einiger dieser Tests soll kurz berichtet werden.

A) Talgdrüzenschwundtest

Nachdem PULLINGER (96) nach Applikation polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe als Frühveränderungen während der ersten drei Tage den Schwund der Talgdrüsen der Mäusehaut beschrieben hatte, bemühten sich zahlreiche Untersucher, diese Beobachtung als Kurzzeittest zu verwenden (12,13,50,69,70,118,119,120,121).

Dabei muß aber beachtet werden, daß zahlreiche Stoffe wie Mitosegifte, z.B. Colchizin und Cytostatika wie Colcemide, Leukeran und Trenimon, ebenfalls zum Schwund der Talgdrüsen führen (58,61). Außerdem scheinen von allen Cancergenen nur die polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe im Talgdrüzenschwundtest wirksam zu sein (12). Der Talgdrüzenschwundtest wird noch heute als Screeningverfahren für die Testung der Inhaltsstoffe des Tabakrauchs verwandt.

B) Carcinogene und Zellkulturen

Seitdem es gelang, Zellkulturen über längere Zeit zu züchten, lag es nahe, in vitro Stoffe auf ihre cancerogene Wirkung zu prüfen, da die Versuchsbedingungen in vitro konstanter gehalten werden können als bei Versuchstieren. EARLE fand z.B., daß 20-Methylcholanthren das Wachstum der Fibroblastenkultur hemmte. Jedoch zeigten Kontrollen dieselben Veränderungen, wenn auch erst nach längerer Züchtung (40).

LASNITZKI (71) sah in Kulturen foetaler menschlicher Lungen nach Zusatz von Zigarettenrauchkondensat generalisierte Neubildung von Bronchioli. Die Kohlenwasserstofffraktion führte zu Basalzellhyperplasie, wobei das sezernierende Epithel erhalten blieb. Erstaunlicherweise führte gerade die kohlenwasserstoff-freie Fraktion zu einem Verlust des sezernierenden Epithels und zu Plattenepithel-metaplasie.

Eine Metaplasie kann zwar die Vorstufe eines Carcinoms sein (57), tritt aber auch bei der einfachen Regene-

ration auf (92). Bei Einwirkung von Carcinogenen auf Zellkulturen lassen sich also mikroskopisch nur unspezifische Veränderungen nachweisen.

C) Mutagene Wirkung der Carcinogene

Einzelne Autoren haben versucht, die mutagene Wirkung einzelner Carcinogene auf Einzeller als Kurzzeittest zu benutzen.

LATARGET (73) prüfte z.B. die Menge der Mutanten von *Escherichia coli* bei Zugabe von Carcinogenen und Nichtcarcinogenen, die gegenüber einem Bakteriophagen resistent wurden, und fand eine gute Korrelation zwischen mutagener und carcinogener Eigenschaft.

BAUCH (7,8) erzielte bei Zugabe von Carcinogenen bei bei Hefen Gigasformen. DRUCKREY (36) beobachtete dasselbe an einem Vielzeller, dem Seeigel.

FUNDER (45) erzeugte mit 9,10 Dimethyl 1,2 Benzanthracen bei *Serratia Plymuthicum* neue Kolonieformen. Jedoch hatte das nicht cancerogene Kampfer dieselbe Wirkung. Sehr aktive Cancerogene wie 20 Methylcholanthren und 1,2,5,6-Dibenzanthracen riefen keine Veränderungen hervor. Damit erwies sich dieser Test ebenfalls als nicht spezifisch für eine carcinogene Wirkung.

D) Molchtest

NEUKOMM (87) untersuchte die Wirkung der Injektion von Carcinogenen in den Schwanz von Molge *cristatus*. Er fand nach 6-18 Tagen Infiltration und Hyperplasie des über der Injektionsstelle befindlichen Plattenepithels, die nach seinen Zusammenstellungen gut mit den Langzeitversuchen an Säugetieren übereinstimmen. ARFFMANN et al. (5) konnten diese Ergebnisse bestätigen, wogegen der Arbeitskreis KRACHTs keine solchen Veränderungen beobachtete (61).

E) Autoradiographie

Die Autoradiographie ist eine Methode zur optischen Darstellung chemischer Vorgänge, die sonst unsichtbar ab-

laufen. Es ist deshalb verständlich, daß die Eignung der Autoradiographie als Kurzzeittest untersucht wurde, besonders nachdem sich herausgestellt hatte, daß viele Kurzzeitteste unbrauchbar sind (65) oder nur auf einzelne Stoffgruppen ansprechen wie z.B. der nur auf polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe reagierende Talgdrüseneschwundtest (12). EVENSEN (43) leistete eine sehr detaillierte Vorarbeit. Er bestimmte gleichzeitig Mitosezahl und Anzahl der markierten Zellen nach Applikation von Carcinogenen und Cocarcinogenen und fand, daß sich die Kurven, die sich bei der Auszählung der markierten Zellen für Carcinogene und Cocarcinogene ergeben, gleichsinnig verhalten. Jedoch hält die Erhöhung ihrer Zahl nach Pinselung mit Carcinogenen länger an. Die Mitosezahl hingegen sinkt bei Anwendung der Carcinogene in den ersten zwei Tagen bis zu einem Minimum, um dann anzusteigen. Hyperplasiogene steigern sofort die Mitosezahl. Auf diesen Ergebnissen suchten DOERMER und OEHLERT (30) einen Kurzzeitversuch aufzubauen, indem sie das Verhältnis von Mitoseindex zu Markierungsindex bestimmten.

Unsere Versuche sollen ein weiterer Beitrag zu diesem Thema sein.

Wie oben berichtet wurde, existieren mehrere Kurzzeitteste zur Prüfung von Carcinogenen und im besonderen von undefinierten Stoffgemischen mit fraglicher carcinogener Potenz. Diese sind jedoch im Gegensatz zu den Langzeittesten nicht spezifisch.

Wir fragten uns, ob die Autoradiographie mit H^3 Thymin, die von anderen Autoren (30) und von uns (35) zur Beobachtung der Cancerisierung verwandt worden war, als Kurzzeittest brauchbare oder sogar spezifischere Ergebnisse zeigen würde, als die oben referierten Tests.

Es sollte geklärt werden:

- 1) ob der von uns im Langzeitversuch festgestellte Lösungsmittelleffekt auch im Kurzzeitversuch nachweisbar ist,
- 2) wie sich im Vergleich dazu ein Carcinogen verhält, und

3) ob signifikante Unterschiede zwischen dem Markierungsindex eines polycyclischen aromatischen kohlenwasserstoffhaltigen und eines polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoff freien Rauchkondensat bestehen.

Die aromatenhaltige Fraktion des Tabakrauchkondensats stellt, wie allgemein angenommen wird, den carcinogenen Anteil dieses Stoffgemisches dar (133,134,135), während dem aromatenfreien Anteil hauptsächlich Promotoreigenschaften zugesprochen werden.

In einer sich an diesen ersten Versuch anschließenden Versuchsreihe sollte

4) eine mögliche Dosis-Wirkungsbeziehung des 9,10 Dimethyl-1,2-benzanthracens (DMBA) geprüft werden.

V. MATERIAL UND METHODIK

Unsere Untersuchungen wurden mit 6 Wochen alten, 20 gr schweren männlichen Mäusen vom Stamm NMRI durchgeführt. Dieser Mäusestamm wurde auch bei früheren Untersuchungen verwendet. Die naturgemäß höhere Rate an Bißverletzungen bei Männchen vermieden wir weitgehend dadurch, daß wir die Tiere einzeln oder höchstens in Dreiergruppen hielten. Tiere mit Biß- und Rasurverletzungen wurden nicht in den Versuch genommen. Es wurden 35 Versuchsgruppen und 2 Kontrollgruppen von je 10 Tieren aufgestellt. Am 42. Lebenstag, 7 Tage vor dem eigentlichen Versuchsbeginn, wurde ihnen der Rücken mit einer elektrischen Haarschneidemaschine rasiert.

Die zu prüfenden Substanzen wurden mit einer Meßpipette auf das rasierte Hautareal getropft, und zwar jeweils um 7³⁰. Wie aus der Tabelle 1 hervorgeht, wurde jede Substanz 1-, 3- und 6mal appliziert. Nach jeder Behandlung wurde eine Pause von einem Tag eingelegt. Die Applikation des H³ Thymidin erfolgte ebenfalls um 7³⁰ durch Einspritzung in die Bauchhöhle, und zwar immer 24 Std. nach der letzten Tropfung. Ausnahmen davon bilden nur die mit 9,10 Dimethyl-1,2 benzanthracen (DMBA) behandelten Tiere, denen

jeweils 4,8,24,48 bzw. 96 Std. nach der letzten Tropfung H^3 Thymidin appliziert wurde. Zur Markierung der DNS synthetisierenden Zellen wurde $2,5 \mu C H^3$ Thymidin mit einer spezifischen Aktivität von $1,9 \mu C / mMol$ pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert und die Tiere 40 min danach getötet. Die entnommenen Hautstücke wurden in 4%igem neutral gepuffertem Formol fixiert. In der üblichen Weise wurden 5 starke Paraffinschnitte hergestellt und mit Photoemulsion (Ilford G 5) überschichtet und 14 Tage exponiert. Die entwickelten und fixierten Schnitte wurden mit Hämatoxinilin gefärbt.

Wir zählten bei 3-6 Versuchstieren jeder Gruppe je 2-3 cm der interfollikulären Epidermis aus. Nur Zellen mit mindestens 5 Silberkörnern über dem Zellkern wurden gewertet. Die unten angegebenen Werte sind bereits die Mittelwerte. Es wurden folgende Versuchsgruppen ausgewertet:

- 1) Kontrollen: Autoradiographie 7 Tage nach Rasur
- 2) Tropfung mit $0,2 \text{ cm}^3$ Aceton
- 3) Tropfung mit $0,2 \text{ ccm}$ Glycerin-Alkohol aa
- 4) Tropfung mit $0,2 \text{ ccm}$ Gesamtkondensat aus Zigarettenrauch, gelöst zu gleichen Teilen in Glycerin-Alkohol.
- 5) Tropfung mit $0,2 \text{ ccm}$ Gesamtkondensat aus Zigarettenrauch, gelöst zu gleichen Teilen in Aceton.
- 6) Tropfung mit $0,2 \text{ ccm}$ aromatenfreiem Kondensat aus Zigarettenrauch, gelöst in Aceton (gewonnen durch Herrn Dozent Dr. Grimmer, Chem. Institut der Univ. Hamburg)*
- 7) Tropfung mit $0,2 \text{ ccm}$ einer 1%igen Lösung von 3,4 Benzpyren in Aceton.
- 8) Tropfung mit $1 \mu g$ 9,10 Dimethyl-1,2 Benzanthrazen (DMBA), gelöst in $0,2 \text{ ccm}$ Aceton.
- 9) Tropfung mit $5 \mu g$ DMBA gelöst in $0,2 \text{ ccm}$ Aceton

* Für die Überlassung der Kondensate danken wir Herrn Doz. Dr. Grimmer, Dr. Neurath und Dr. Elmenhorst.

- 10) Tropfung mit 10 gamma DMBA, gelöst in 0,2 ccm Aceton
- 11) Tropfung mit 25 gamma DMBA, gelöst in 0,2 ccm Aceton
- 12) Tropfung mit 100 gamma DMBA, gelöst in 0,2 ccm Aceton.

Die Tropfung erfolgte in den Gruppen 2-7 1,3 und 6mal. Zwischen die einzelnen Tropfungen wurde je ein behandlungsfreier Tag gelegt.

In den Gruppen 8-12 wurden die Tiere nur einmal behandelt, jedoch wurde ihnen zu verschiedenen Zeiten H^3 Thymidin injiziert, und zwar nach 4,8,24,48 bzw. 96 Stunden nach der Tropfung. Es sollte hier die Abhängigkeit des Markierungsindex einerseits von der applizierten Konzentration und andererseits von der bis zur Markierung verstrichenen Zeit geprüft werden.

VI. ZUR METHODIK

1. Begründung der 7 Tage langen Pause zwischen Rasur und Versuchsbeginn

BOCK und MOORE (11) fanden im Langzeitversuch keine höhere Tumorrates, wenn die Tiere rasiert oder die Haut mit Sandpapier gerieben wurde. Aber in unseren Versuchen darf man dieses Moment keinesfalls vernachlässigen, da es nach jeder Verletzung zu gesteigerter Zellaktivität mit vermehrter Zellproliferation und damit verstärkter DNS-Synthese kommt. Wir wählten den siebten Tag nach der Rasur als Versuchsbeginn, weil akzidentelle Verletzungen durch die Rasur zu diesem Zeitpunkt schon ausgeheilt sind und die Mitoseaktivität den Normalwert erreicht hat (17,93). Männliche Tiere sind bekanntlich aggressiver, und so kann es leicht zu störenden Bißverletzungen kommen, die wir durch Einzelhaltung vermieden. Wurden bis zu drei Tiere in einem Käfig gehalten, nahmen wir Tiere mit Bißverletzungen nicht in den Versuch. Ergab sich histologisch ein Epitheldefekt, so wurde dieser Schnitt verworfen.

2. Interfollikuläre Zählung

In nicht referierten Voruntersuchungen wurden Präparate dieser Versuchsreihe zum Vergleich sowohl interfollikulär als auch die gesamte Epidermis einschließlich der Follikel ausgewertet. Einige Präparate wurden auch von mehreren Untersuchern ausgewertet, um den durch den Untersucher entstehenden Fehler festzustellen. Auf Grund der Ergebnisse entschieden wir uns für die interfollikuläre Zählung, die hohe Proliferationsrate in den Haarfollikeln, die wechselnden Anschnitte der Follikel, die einmal fast gar nicht, dann wieder in ganzer Länge getroffen wurden, ergaben sehr stark voneinander abweichende Werte der Markierungsindices. Demgegenüber wichen die Zählergebnisse verschiedener Untersucher am gleichen Präparat nur geringfügig voneinander ab.

3. Mäusestamm

Die Empfindlichkeit verschiedener Inzuchtstämme gegenüber Carcinogenen ist unterschiedlich: z.B. fanden COWDRY und SUNTZEFF (28), daß die Haut von CBA Mäusen gegenüber Methylcholanthren widerstandsfähiger ist als die der New Buffalo Mäuse.

In unseren Versuchen verwandten wir den Mäusestamm NMRI.

4. Alter

Bei manchen Mäusestämmen zeigte sich eine Altersabhängigkeit der Neigung, Carcinome zu entwickeln. COWDRY et al.(28) fanden junge New Buffalo Mäuse empfindlicher als alte, dagegen konnte bei CBA Mäusen keine Differenz festgestellt werden. SUNTZEFF et al. (118) berichten, daß neugeborene Swiss Mäuse keine Hautcarcinome entwickelten, wenn Methylcholanthren appliziert wurde. Die Carcinogenese wird wahrscheinlich durch die bei Neugeborenen besonders dicke Epidermis, die noch nicht ausgebildeten Haarfollikel und Talgdrüsen verhindert. Es wurde deshalb darauf geachtet, daß unsere Versuchstiere gleichaltrig waren.

5. Geschlechtsabhängigkeit

BULLOUGH (17,18,19) hat am gründlichsten die Mitoserate bei der weiblichen Maus untersucht. Er fand ein Maximum im Präöstrus und im frühen Östrus, was mit dem Ergebnis von COWDRY (27) übereinstimmt. Das Minimum fand er für den ersten Tag des Diöstrus. Die Dicke der Epidermis verhält sich zu der Mitoserate gleichsinnig. Sie besteht im frühen Östrus aus den meisten Epithelzellagen und verdünnt sich bis zum ersten Tag des Diöstrus. Um diese zyklusabhängigen Schwankungen zu vermeiden, verwandten wir nur männliche Mäuse.

6. Haarwuchszyklus

Eine nicht zu unterschätzende Rolle in der epidermalen Carcinogenese spielt bei der Maus der Haarwuchszyklus, der möglicherweise für stark voneinander abweichende Ergebnisse verschiedener Autoren (14) verantwortlich ist.

Wie bekannt ist, durchläuft das Haarkleid der Maus zyklisch Wachstums- und Ruhezeiten. Man unterscheidet eine anagene, katagene und telogene Phase (DRY) (38), wobei die anagene Phase der Wachstumsperiode, die katagene der Rückbildungsperiode und die telogene der Ruheperiode entspricht. Die erste Ruheperiode beginnt zwischen dem 15. und 19. Tag und dauert nur 8-10 Tage. Die zweite Ruhephase erscheint für Versuche geeigneter, weil sie etwa 25 Tage dauert. Ihr Beginn scheint je nach Tierstamm zu variieren. DRY gibt den 45. Tag an. Für den in unseren Versuchen verwendeten Stamm NMRI fand MOCH (80) auch jahreszeitliche Unterschiede, wobei im Winter die zweite Ruhephase zwischen 47. und 55. Tag, im Sommer zwischen 55. und 67. Tag begann. Nach ihm ist es zweckmäßig, die Tiere mit 6-7 Wochen zu beziehen. Unsere Tiere waren 6 Wochen alt, wurden rasiert und nach 7 Tagen, also mit insgesamt 49 Tagen, in den Versuch genommen. Sie befanden sich also mit großer Wahrscheinlichkeit in der Ruhephase.

7. Lichteffekte

Hat das Licht einen Einfluß auf die Carcinogenese? Einzelne Autoren berichten darüber. Wurden z.B. Mäuse im Dunkeln gehalten, so entwickelten sich nach Applikation von 3,4 Benzpyren und 20 Methylcholanthren mehr Hautcarcinome als bei Mäusen, die täglich 2 Std. dem Licht ausgesetzt waren (MORTON et al. 1951) (83). Das Licht scheint das Benzpyren zu zerstören, jedenfalls fand MILLER (73) eine Verringerung der fluorescierenden Benzpyrenproteinverbindungen nach Einwirkung von Sonnenlicht auf $1/10 - 1/3$ des Dunkelwertes.

Wir hielten unsere Mäuse in Räumen, die durch Tageslicht schwach beleuchtet wurden.

8. Tageszeitunterschiede

Von mehreren Untersuchern (10,18,25,81,94) ist auf die je nach Tageszeit unterschiedliche Mitoserate hingewiesen worden. Die einzelnen Forscher fanden für die Maus recht unterschiedliche Zeitwerte, stimmen aber darin überein, daß die höchste Mitoserate am Tage besteht. BULLOUGH (18) findet dieses Maximum in den Nachmittagsstunden (was mit Untersuchungen am Menschen übereinstimmt), COOPER (25) gibt es mit 10 Uhr AM, MONTAGNA (81) zwischen 10 Uhr AM und 4 Uhr PM, ORTIZ PICON (94) mit 12 Uhr an. Das Mitoseminimum liegt bei COOPER (25) um 10 Uhr PM, bei ORTIZ PICON (94) zwischen 19 und 24 Uhr. BLUMENFELD (10) fand an der Haut der Ratte ähnliche Werte (Maximum 8^{30} Minimum 20^{30}).

Wenn auch die genauen Stundenwerte von Autor zu Autor variieren, so ergibt sich doch aus diesen Ergebnissen, daß die Tageszeit ganz und gar nicht gleichgültig ist. Um diese Variable soweit wie möglich konstant zu halten, applizierten wir das H^3 Thymidin immer zur gleichen Tageszeit, um 7^{30} . In der mit DMBA behandelten Gruppe konnte diese Schwankung im 4- und 8-Stundenversuch nicht ausgeschaltet werden. Im 24, 48 und 96-Stundenversuch war die Tageszeit aber wieder dieselbe.

9. Tötungszeit

Wie DOERMER et al. (31) feststellten, sind bei der Autoradiographie selbst in hyperplastischer Epidermis und in Carcinomen Mitosen nach 40 Minuten noch nicht markiert. Das bedeutet, daß die Zellen vor jeder Teilung in eine Ruhephase treten, die mindestens 40 Minuten dauert (66,77). Wir töteten daher in unseren Versuchen die Tiere 40 Minuten nach der H^3 Thymidininjektion und vermieden dadurch, daß sich die strahlende DNS auf zwei Zellen verteilte.

10. Lösungsmittel

Wie in der Fragestellung berichtet, wünschten wir zu klären, ob Lösungsmittel im Kurzzeitversuch die Wirkung der Carcinogene ebenso beeinflussen wie im Langzeitversuch. CRABTREE (29) berichtet z.B., daß 1,2,5,6 Dibenzanthracen bei Lösung in einem Gemisch aus Aceton und Paraffinum liquefactum in 100% Carcinome erzeugte, dagegen bei Lösung in Benzol nur in 40%. SIMPSON et al. (112) zeigten, daß Methylcholanthren seinen carcinogenen Effekt verliert, wenn es in Lanolinum anhydricum gelöst wird. Der Effekt des Glycerin-Alkohols, des Lanolins und des Benzols könnte auf einer Penetrationshemmung des Carcinogens in die Haut beruhen.

In einem anderen Kurzzeitversuch, dem Talgdrüsen-schwundtest, konnten KRACHT und HÜBNER (61,69) zeigen, daß sich die Lösungsmittel im Kurzzeitversuch ähnlich verhalten wie im Langzeitversuch.

11. Autoradiographie

a) Thymidin

Der Aufbau der DNS ist gut bekannt: Sie setzt sich aus Nukleotiden (= Nukleinsäuren) zusammen, die aus einer Base, einem Zucker und Phosphorsäure bestehen. Wird die Phosphorsäure vom Nukleotid abgespalten, so erhält man das Nukleosid. Thymidin ist ein solches Nukleosid, das im Gegensatz zu anderen Nukleosiden ausschließlich in die DNS eingebaut

wird (44,99). Es besteht aus der Base Thymin und dem ZuckerD-Desoxyribose, der glykosidisch gebunden ist. Durch die Autoradiographie mit Thymidin werden also diejenigen Zellen markiert, die sich gerade in DNS-Synthesephase befinden.

b) H³Thymidin

H³Thymidin entsendet nur Beta-Strahlung, die keine große Eindringtiefe hat. Die mittlere Energie, mit der die Elektronen emittiert werden, beträgt 5690 eV, und sie dringen in wässrigem Medium nach FIRKET (44) etwa 1,2 Mikron, nach EVENSEN (43) 1,5 Mikron ein. Das bedeutet, daß bei unseren 5 Mikron starken Schnitten sich nur Kerne innerhalb 30% der Schnittdicke abbilden können, womit nach EVENSEN (43) 70% der Zellkerne erfaßt werden. Diese geringe Penetrationsfähigkeit der Beta-Strahlung hat den Vorteil, daß die Emulsion nur direkt über dem Kern getroffen und geschwärzt wird. Der oben erwähnte Fehler durch die fehlende Abbildung der Kerne in den tieferen Schichten schien uns nicht wesentlich zu sein, da er für alle Schnitte in gleicher Weise zutrifft und somit vernachlässigt werden kann. Es kam uns nicht auf die absoluten Zahlen an, sondern auf die Relationen zueinander.

c) Verfügbarkeit des Thymidins

Nach den Untersuchungen von MAURER und KOBURG (77) ist das H³Thymidin nur kurze Zeit im Körper frei verfügbar. Schon nach 40 Minuten fanden sie keinen Einbau in die DNS mehr. Neben der prämitotischen Ruhephase, die, wie oben berichtet, ebenfalls 40 Minuten beträgt, war dies ein weiterer Grund, die Tiere nach 40 Minuten zu töten.

d) Markierung durch andere Elemente

Man verzichtete lange Zeit (3) auf die Verwendung von H³Thymidin, da man befürchtete, daß sich der schwere Wasserstoff leicht vom Kohlenstoffring lösen würde. Eine chemische Analyse wäre während der Autoradiographie nicht mehr mög-

lich gewesen, und so hätten sich unkontrollierbare Fehler einschleichen können. Man verwandte deshalb P^{32} und C^{14} (44). Doch P^{32} wurde auch in andere Verbindungen eingebaut, z.B. in die Ribonukleinsäuren. Selbst in lebhaft wachsenden Geweben blieb die Markierung der DNS gering. Die Kerne wurden also nicht selektiv markiert. In geringerem Maße gilt das gleiche für C^{14} , mit dem Purin, seine Nukleoside oder die Orotsäure markiert wurden. Erst als man einen spezifischen Vorläufer der DNS, C^{14} Thymidin, verwendete, ergaben sich bessere Ergebnisse (PLAUT, MASCIA) (95).

e) Markierungsindex

Der Markierungsindex ist in dieser Arbeit als Verhältnis der Zahl der markierten Zellen zur Gesamtzahl der Epidermiszellen definiert. Er ist nach DOERMER und OEHLERT (30) ein Gradmesser des Zellumsatzes und damit der Zellaktivität. Durch Carcinogene und Cocarcinogene wird er erhöht. Theoretisch könnte die Höhe des Index von mehreren Faktoren abhängen; und zwar einerseits von der Länge der einzelnen Lebensphasen einer Zelle - Wachstums-, Differenzierungs-, DNS-Synthese-, praemitotische Ruhe- und Mitosephase - und andererseits von der Dauer der Verfügbarkeit des H^3 Thymidins nach Injektion. Ein höherer Markierungsindex könnte z.B. dadurch entstehen, daß bei konstanter Generationszeit die DNS-Synthesezeit verlängert wäre, so daß mehr Zellen gleichzeitig H^3 Thymidin einbauen könnten und markiert wären. Nach den Untersuchungen von DOERMER, TULINIUS und OEHLERT (31) unter anderen ist dies aber nicht der Fall, sondern sogar in der Carcinomzelle bleibt die DNS-Synthesephase gleichlang. Dagegen ist die G_1 Phase verkürzt. Durch gleichzeitige Bestimmung des Markierungsindex und des Mitoseindex stellten DOERMER und OEHLERT (30) auch eine Hemmung der intermitotischen Zellen in der G_2 Phase bzw. eine Hemmung der Mitoseauslösung mit der Folge von Polyploidisierung durch Carcinogene fest.

VII. VERSUCHSERGEBNISSE

In den Tabellen 1 und 2 sind die Mittelwerte der Markierungsindices aufgeführt, die aus dem Verhältnis markierter Zellen zur Gesamtzellzahl ermittelt wurden. In unseren Tabellen ist die Anzahl der markierten Zellen pro 1000 Zellen angegeben. Der Markierungsindex wurde aus den Werten von 14 Tieren bei den Kontrollen und von 3-6 Tieren bei den einzelnen Versuchsgruppen ermittelt, da selten mehr Präparate eine intakte Epidermis zeigten, die für die Auswertung nötig war.

In der Tabelle 1 bestehen für die Werte von Aceton und Glycerin-Alkohol keine Unterschiede untereinander und zu dem Markierungsindex der Kontrollen. Der Wert der Kontrollen stimmt mit dem von SCHULTZE und OEHLERT (109) gefundenen nicht völlig überein. Sie fanden einen Wert von 0,40. In den übrigen Versuchsgruppen zeigt sich eine Erhöhung vom 3fachen bis zum 9fachen Wert der Kontrollen. Es zeigten sich ebenfalls keine größeren Unterschiede zwischen der Applikation des Gesamtkondensats in den beiden Lösungsmitteln. Es fällt auf, daß nach einmaliger Applikation des Gesamtkondensats, aus dem die aromatische Fraktion entfernt ist, der Wert höher ist als der beim Gesamtkondensat oder Benzpyren. Nach dreimaliger und sechsmaliger Tropfung fallen die Werte, sind aber nicht niedriger als beim Gesamtkondensat. Nur der Markierungsindex des Benzpyrens steigt nach sechsmaliger Behandlung auf einen sehr viel höheren Wert als das aromatenfreie Gesamtkondensat.

Aus der Tabelle 2 läßt sich ablesen, daß nach Applikation von DMBA der Markierungsindex gegenüber den Kontrollen jeweils um mindestens das Doppelte ansteigt. Lediglich bei einer Konzentration von 25 Gamma sinkt der Wert nach 4 Stunden sogar unter den der Kontrollen.

Tabelle 1

Applizierte Substanz	3H-Markierungsindex		
	nach 1maliger Beh.	nach 3maliger Beh.	nach 6maliger Beh.
Aceton 0,2 ccm	0,028	0,036	0,030
Glycerin-Alkohol aa 0,2 ccm	0,042	0,028	0,025
Gesamtkondensat in Aceton aa 0,2 ccm	0,123	0,105	0,102
Gesamtkondensat in Glycerin- Alkohol aa 0,2 ccm	0,107	0,108	0,087
Aromatenfreies Gesamtkondensat in Aceton aa 0,2 ccm	0,167	0,093	0,101
Benzpyren in Aceton 0,2 ccm einer 1 % Lösung	0,131	0,113	0,274

3H-Markierungsindex d. Kontrollen: 0,032

Tabelle 2:

		H3-Markierungsindex nach				
Applizierte Substanz		4 Stunden	8 Stunden	24 Stunden	48 Stunden	96 Stunden
DMBA	1	-	-	0,108	0,080	0,078
DMBA	5	-	-	0,112	0,083	0,050
DMBA	10	-	-	0,086	0,090	0,088
DMBA	25	0,016	0,057	0,082	0,166	0,092
DMBA	100	-	-	0,070	0,123	0,122

1
2
1

VIII. DISKUSSION

Lösungsmittelleffekt

Von mehreren Seiten (29,117,118) ist über einen Lösungsmittelleffekt im Langzeitversuch berichtet worden. Uns drängte sich die Fragestellung durch die Ergebnisse eines früheren Langzeitversuches auf (35). Es wurden 600 männlichen Mäusen dreimal wöchentlich Tabakrauchkondensat 1:1 in Glycerin-Alkohol gelöst auf die rasierte Rückenhaut getropft. Bei jeder Tropfung wurden 30 mg appliziert. Nach einer Versuchsdauer von 570 Tagen waren nur 2 Plattenepithelcarcinome und 1 Sarkom entstanden. Dieses Ergebnis erstaunte, da z.B. WYNDER et al. (137) in 44,4% Plattenepithelcarcinome erzielten, als sie Zigarettenrauchkondensat im Verhältnis 1:1 in Aceton lösten und für maximal 24 Monate dreimal wöchentlich applizierten. Im Kurzzeitversuch zeigt sich diese unterschiedliche Wirkung aber nicht. Der Markierungsindex ändert sich nicht signifikant, wenn das Gesamtkondensat in Aceton oder in Glycerin-Alkohol gelöst wird. Auch die Lösungsmittel als solche haben keinen voneinander abweichenden Markierungsindex. Er unterscheidet sich nicht von den Kontrollen. In dieser Hinsicht ist also die Autoradiographie als Kurzzeittest unbrauchbar, da sie im Langzeitversuch erkennbare Differenzen nicht zeigt.

Verhalten eines reinen Carcinogens: Benzpyren

Benzpyren führte nach sechsmaliger Applikation zur stärksten Erhöhung des Markierungsindex. Die in unseren Versuchen applizierte Konzentration von $0,2 \text{ cm}^3$ einer 1% Lösung ist zwanzigfach höher als die im Gesamtkondensat gefundene Menge an Benzpyren- $0,96 \text{ mcg/g}$ Kondensat. Doch ist der Markierungsindex nur etwa zweieinhalbmals so groß wie der des Gesamtkondensats nach sechsmaliger Applikation. Nach ein- und dreimaliger Tropfung unterscheiden sich die beiden Werte nur geringfügig. Daraus kann man schließen, daß Benzpyren allein nicht für die carcinogene Potenz des Gesamt-

kondensats verantwortlich ist. Doch wird diese Schlußfolgerung in Frage gestellt, wenn man die Werte des aromatenfreien Gesamtkondensats betrachtet. Hierauf soll im folgenden Kapitel eingegangen werden.

Veränderung des Markierungsindex durch Carcinogene und Cocarcinogene

Sowohl Carcinogene als auch Cocarcinogene erhöhen den Markierungsindex (DOERMER, OEHLERT) (30). Dies wird in unserem Versuch durch den Vergleich der Werte des Gesamtkondensats mit denen des aromatenfreien Kondensats belegt. Aus dem aromatenfreien Kondensat sind die wichtigsten Carcinogene entfernt, und doch ist sein Markierungsindex mindestens gleich hoch. Nach einmaliger Tropfung ist er sogar höher als beim Gesamtkondensat. Man kann also mit Hilfe der autoradiographischen Ergebnisse allein nicht auf die carcinogene Wirksamkeit des applizierten Stoffes schließen. Wir bestätigen damit die Ergebnisse von DOERMER und OEHLERT (30), die nur mit gleichzeitiger Zählung der Mitosen eine Aussage machen konnten. Nach Carcinogenen fanden sie eine Mitosehemmung, die BERG (7) auch in seinen nichtautoradiographischen Untersuchungen fand. So führte Benzpyren zu einer Störung der Mitose, während Promoterstoffe wie Crotonöl und Cantharidin die Mitose nicht beeinflussten.

DMBA: Zeit-Wirkungsbeziehung

(Abhängigkeit des Markierungsindex von der zwischen DMBA-Applikation und H^3 Thymidin-Injektion verstrichenen Zeit)

Wir betrachten die verschiedenen Markierungsindices bei einer Konzentration von 25 gamma DMBA. Es fällt auf, daß nach 4 Stunden der Markierungsindex auf 0,016 (Kontrollen 0,032) gefallen ist. Es muß also die DNS-Synthese gehemmt worden sein. Man wäre versucht, dieses Ergebnis als Fehler anzusehen, wenn nicht EVENSEN (43) sowohl für DMBA als auch für 3,4 Benzpyren und Methylcholantren dieselbe Hemmung der DNS-Synthese gefunden hätte. Er vermutet eine

Schädigung von Zellenzymen, die DNS synthetisieren. Eine direkte Reaktion des Carcinogens mit der DNS hält er für unwahrscheinlich, da die Carcinogene nie im Zellkern, sondern nur perinukleär gefunden wurden (HAMPERL, GRAFFI, LANGER 1943) (59), AHLSTRÖM, BERG 1947) (2), NORDEN 1954) (89).

Nach 8 Stunden haben sich die Zellen offenbar erholt, und der Markierungsindex ist nun auf 0,057 erhöht. Bis zum 48-Stundenwert steigen die Werte weiter deutlich an, um dann langsam wieder abzufallen. Ein Vergleich unserer Werte mit denen EVENSENS (43) für 25 gamma DMBA ergibt eine gute Übereinstimmung.

DMBA: Dosis-Wirkungsbeziehung

(Abhängigkeit des Markierungsindex von der DMBA-Dosis)

Betrachtet man die Markierungswerte, die nach gleichen Zeiträumen mit ansteigenden Konzentrationen DMBA gewonnen werden, so findet man (außer für die 96-Stundenwerte) keine Parallelität zwischen DMBA Konzentration und Zahl der markierten Zellen. Nach 24 Stunden ist der Markierungsindex am höchsten bei der Konzentration von 5 gamma (0,112), bei 10 gamma ist er schon geringer, und bei 100 gamma beträgt er nur 0,070.

Nach 48 Stunden steigt der Index zunächst mit steigenden Konzentrationen, fällt jedoch von dem bei 25 gamma erreichten Höchstwert von 0,166 auf 0,123 bei 100 gamma ab.

Nach 96 Stunden ist ein (nahezu) kontinuierlicher Index-Anstieg entsprechend der Konzentrationserhöhung zu sehen.

Eine Möglichkeit, dieses Verhalten zu erklären, wäre folgende: Geringe Konzentrationen DMBA (1-5 g) stimulieren die DNS-Synthese nach 24 Std. am stärksten, nach 48 bzw. 96 Stunden fallen die Werte ja beträchtlich. Bei höheren Konzentrationen, etwa ab 10 g, ist die Toxizität der DMBA so stark, daß die DNS-Synthese zunächst gehemmt wird. Nach etwa 48 Stunden ist die toxische Wirkung für die Konzentration von 10-25 gamma abgeklungen, und die DNS-Synthese

wird nunmehr angeregt. 100 gamma sind anscheinend so toxisch, daß der Markierungsindex nie den 43-Stundenwert bei 25 gamma erreicht. Die DNS-Synthese ist so geschädigt, daß sich die Proliferationsanregung nicht mehr voll auswirken kann.

Das stimmt auch gut damit überein, daß Konzentrationen, die 100 gamma übersteigen, zu Ulcerationen führen (SKJÄGGER-STAD) (115).

Vergleich mit EVENSENs Crotonöl-Untersuchungen

Vergleicht man die Kurve der Markierungsindices nach DMBA mit der nach Crotonöl, so läßt sich kaum ein Unterschied feststellen. Die Crotonölkurve fällt lediglich etwas schneller zum Normbereich ab als die des Carcinogens. Doch läßt sich daraus schwerlich eine Aussage über die Eigenschaften z.B. eines unbekannten Stoffgemisches machen.

DOERMER und OEHLERT (30) bestimmen zusätzlich zum Markierungsindex noch die Mitosezahl und versuchen dadurch, Carcinogene von Cocarcinogenen zu unterscheiden. Tatsächlich ergibt sich nach Applikation eines Carcinogens am 2. Tag eine starke Erniedrigung der Mitoserate (EVENSEN) (43), die aber nur bis zum 3. Tag bestehen bleibt. Es ist deshalb zweifelhaft, ob das Verhältnis von Mitoseindex zu Markierungsindex ein sicheres Kriterium darstellt.

Zur Schnelltestung cancerogener Substanzen erscheint uns deshalb die autoradiographische Bestimmung des Markierungsindex selbst bei zusätzlicher Bestimmung des Mitoseindex als unbefriedigend.

IX. ZUSAMMENFASSUNG

Einleitend wird ein kurzer geschichtlicher Abriß der bisherigen Untersuchungen zum Thema: Rauchen und Carcinomentstehung gegeben. Anschließend wird kurz auf die chemische Zusammensetzung des Tabakrauchs eingegangen und auf die zentrale Bedeutung der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) hingewiesen. Weiterhin werden die

Vor- und Nachteile der Lang- und insbesondere verschiedener Kurzzeitversuche zur Testung carcinogener Substanzen diskutiert. Da die bisher erprobten Kurzzeitversuche nicht voll befriedigen, sollte in dieser Arbeit die Autoradiographie auf ihre Eignung als Kurzzeittest geprüft werden.

Die Versuche wurden mit männlichen Mäusen des Stamms NMRI durchgeführt. Die auf ihre cancerogene Wirkung zu prüfenden Substanzen wurden ein- oder mehrmals auf die Mäusehaut getropft und nach einer gewissen Zeit das H^3 Thymidin injiziert. Die genauen Versuchsbedingungen und die Einzelheiten der Methodik werden geschildert und begründet.

In der ersten Versuchsreihe wurde der Markierungsindex nach Applikation von Zigarettenrauchgesamt-kondensat, gelöst in Glycerin-Alkohol bzw. in Aceton, von aromaten-freiem Kondensat, gelöst in Aceton, von 3,4 Benzpyren, gelöst in Aceton, sowie von den beiden Lösungsmitteln allein, bestimmt.

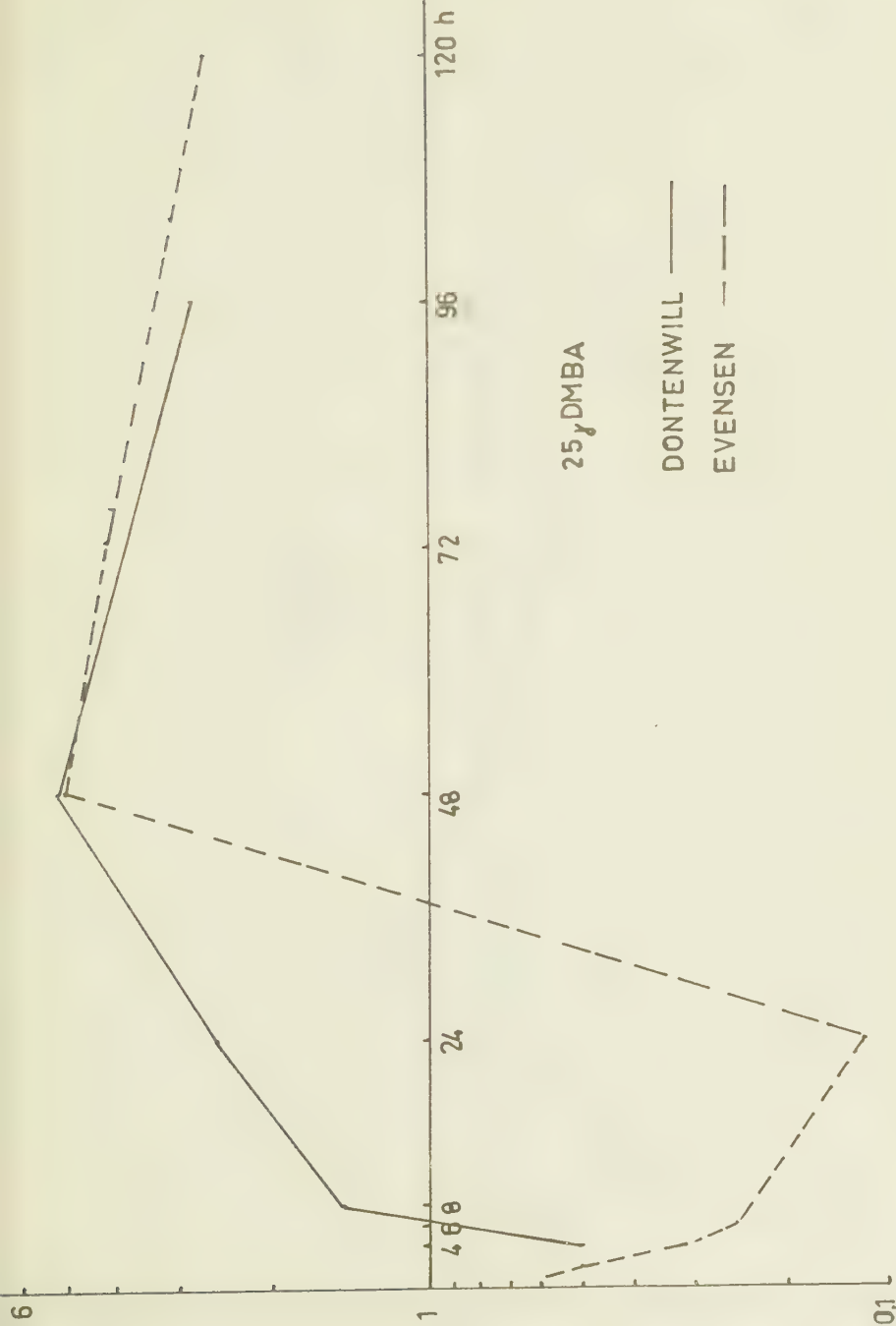
In einer zweiten Versuchsreihe wurde eine mögliche Zeit- und Dosis-Wirkungsbeziehung bei der Applikation von 9,10 Dimethyl 1,2 benzanthrazen überprüft.

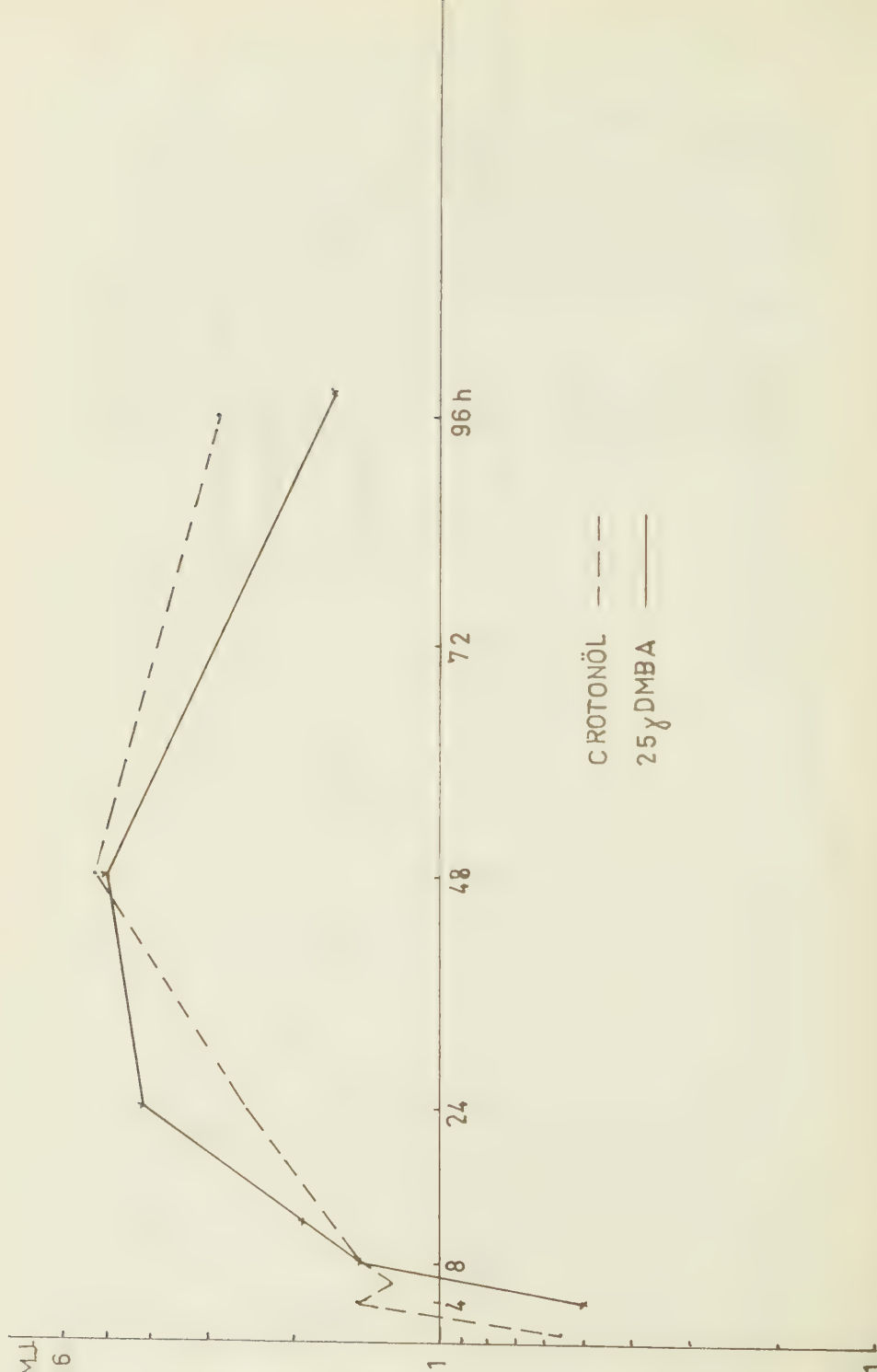
Wir kamen zu folgenden Ergebnissen:

- 1) Nach der Applikation der Lösungsmittel wurde keine Erhöhung des Markierungsindex gegenüber den Kontrollen gefunden.
- 2) In den übrigen Versuchsgruppen stieg der Index stark an.
- 3) Dabei fiel auf, daß das aromatenfreie Kondensat, dem die wirksamen Carcinogene fehlen, einen ebenso hohen Index bewirkte wie das Gesamtkondensat oder das Benzpyren.
- 4) In der Versuchsreihe mit 9,10 Dimethyl-1,2-benzanthracen (DMBA) zeigte der 4 Stundenwert bei einer Konzentration von 25 Gamma eine Hemmung der DNS-Synthese gegenüber den Kontrollen. Nach 8 Stunden kam es dann zum Anstieg des Index, der bis zu dem 48 Stundenwert anhielt, um dann wieder abzufallen.

5) Es ließ sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung ablesen: Bei einer Konzentration von 5 Gamma stieg der Markierungsindex nach 24 Stunden, bei einer Konzentration von 25 Gamma nach 48 Stunden auf den höchsten Wert. Ein kontinuierlicher Anstieg entsprechend der Dosiserhöhung findet sich erst nach 96 Stunden. Es wird versucht, diese Beziehungen durch die anfängliche DNS-Synthesehemmung des Carcinogens zu erklären.

Auf Grund unserer Ergebnisse erscheint die Autoradiographie als Kurzzeittest nicht besonders geeignet, unbekannte Stoffgemische auf ihre carcinogene Potenz zu prüfen.





1.1.

0.16

0.1

0.01

4

8

5%

1%

2%

10%

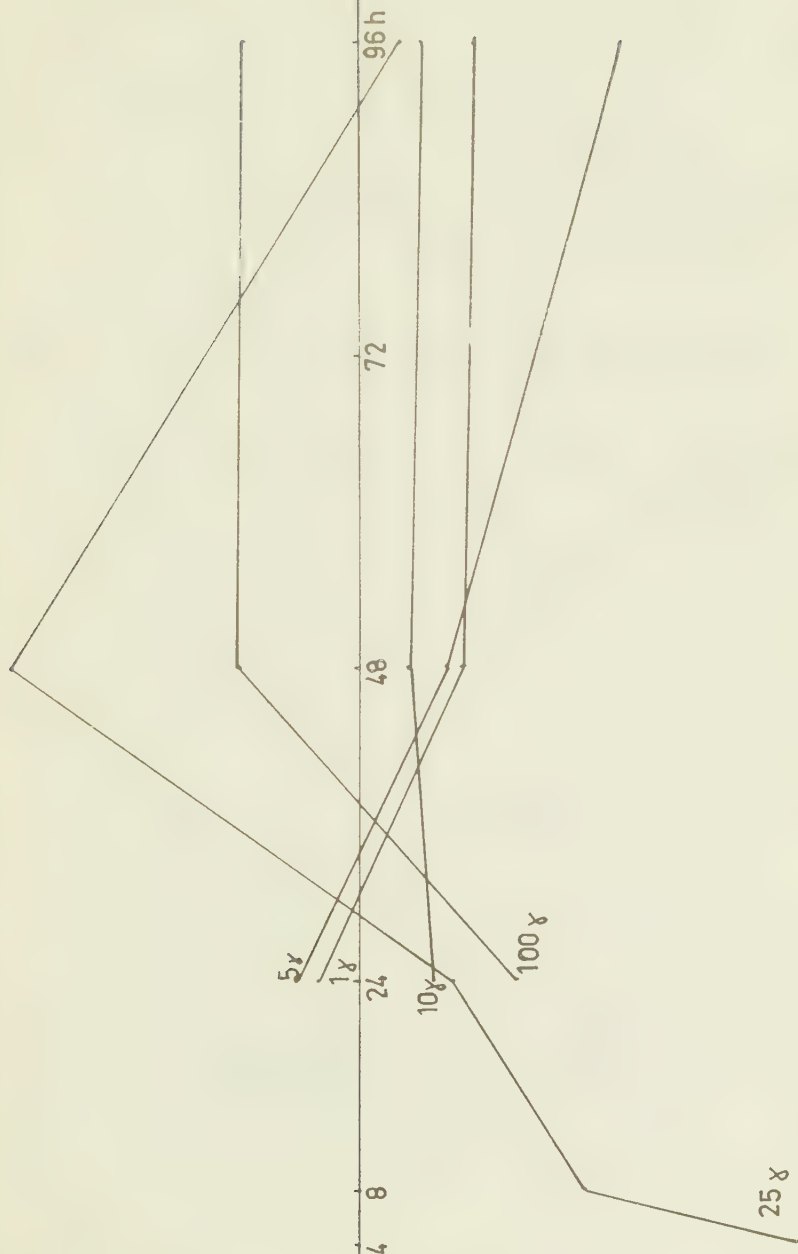
100%

25%

48

72

96h



XI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ABELIN, Th.: Zschr. F. Präventivmed. 6, 349-366 (1961)
Rauchen als Ursache des Lungenkrebs
- 2) AHLSTRÖM, C.G., BERG, N.D.: Fluorescence analysis of the histological localization of 3,4 Benzpyren in mouse skin with special regard to variations between different areas of the skin. Acta path. microbiol. scand. 24, 283-298 (1947)
- 3) ANDRESEN-CHAPMANN, C.: Autoradiographs of algae and ciliates exposed to triated water. Exp. Cell Res. 4, 239-242 (1953)
- 4) APPEL, M., STRAUSS, A.A., KOLISCHER, G.: The effect of 1,2,5,6 Dibenzanthracene on the growth of Brown Pearce Rabbit carcinoma. Am. J. Cancer 33, 239-245 (1938)
- 5) ARFFMANN, E., CHRISTENSEN, B.: Studies on the new test for carcinogenicity. I. Benzopyrene, Dibenz (a,b) anthracene and 3Methylcholanthrene. Acta path. Microbiol. Scand. 52, 330-342 (1961)
- 6) BARKEMEYER, H., SEEHOFER, F.: Über eine neue Methode zur Niederschlagung von Tabakrauch in Flüssigkeiten. Beitr. z. Tabakforschung 1, 93-96 (1961)
- 7) BAUCH, R.: Experimentelle Auslösung von Gigasmutationen bei der Hefe durch carcinogene Kohlenwasserstoffe. Naturwissenschaften 30, 263-264 (1942)
- 8) BAUCH, R.: Chemogenetische Untersuchungen an der Hefe. Ber. dtsch. bot. Gesch. 60, 42-63 (1942)
- 9) BERG, N.O.: Comparision of the epidermal hyperplasia in the skin of mice after application of carcinogenic and noncarcinogenic irritants. Acta path. Microbiol. Scand. 25, 34-44 (1948)

- 10) BLUMENFELD, C.M.: Periodic mitotic activity in the epidermis of the albino rat. *Science* 90, 446-447 (1939)
- 11) BOCK, F.G., MOORE, G.E.: The significance of mouse skin tests of cigarette smoke condensate. *Tobacco and Health* p. 72-86 (1962)
- 12) BOCK, F.G., and MUND, R.: Evaluation of substances causing loss of sebaceous glands from mouse skin. *J. Investigation Dermat.* 26, 479-487 (1956)
- 13) BOCK, F.G., and MUND, R.: A survey of compounds for activity in the suppression of mouse sebaceous glands. *Cancer Res.* 18, 887-892 (1958)
- 14) BORUM, K.: The role of the mouse hair cycle in epidermal carcinogenesis. *Acta path. microbiol. scand.* 34, 542-553 (1954)
- 15) BROCK, N., DRUCKREY, H., HAMPERL, H.: Zur Wirkungsweise cancerogener Stoffe. *Arch. klinische Chir.* 194, 250-263 (1938-39)
- 16) BROSCH, A.: Theoretische und experimentelle Untersuchungen zur Pathogenesis und Histogenesis der malignen Geschwülste. *Arch. path. Anat.* 162, 32-34 (1900)
- 17) BULLOUGH, W.S.: Mitotic activity in the adult female mouse, *mus musculus*. A study of its relation to the oestrus cycle in normal and abnormal conditions. *Philosoph. Transactions Roy. Soc. B* 231, 453-516 (1946)
- 18) BULLOUGH, W.S.: Epidermal mitotic activity in the adult female mouse. *J. Endocrinology* 6, 340-349 (1949-50)
- 19) BULLOUGH, H.F.: Cyclical changes in the skin of the mouse during the oestrus cycle. *J. Endocrinol.* 3, 280-287 (1942-44)
- 20) BUU-HOI, N.P.: *Kanzerogene Stoffe in: Medizinische Grundlagenforschung Bd. II*, 465-550, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1959)

- 21) CARRUTHERS, C.: Chemical studies on the transformation of mouse epidermis to squamous-cell carcinoma: a review *Cancer Res.* 10, 255-265 (1950)
- 22) COOK, J.W., HEWETT, C., HIEGER, I.: Coal tar contents and cancer. *Nature* 130, 926 (1932)
- 23) COOK, E.S., HART, M.J., JOLY, R.A.: The effect of 1,2,5,6 dibenzanthracene on the growth and respiration of yeast. *Amer. J. Cancer* 35, 543-545 (1939)
- 24) COOPER, A., BOTT, H.G., CHEESEWORTH, H.D., TIPSON, R.S.: The role of tobacco smoking in the production of cancer. *J. Hyg.* 32, 293-300 (1932)
- 25) COOPER, Z.K., FRANKLIN, H.C.: Mitotic rhythm in the epidermis of the mouse. *Anat. Rec.* 78, 1-8 (1940)
- 26) COTE, I., OEHLERT, W., BÜCHNER, F.: Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Synthese während der experimentellen Cancerisierung der Leberparenchymzelle der Ratte durch Diäthylnitrosamin. *Beitr. path. Anat. allg. Path.* 127, 450 (1962)
- 27) COWDRY, E.V.: Epidermal carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* 1, 57-98 (1953)
- 28) COWDRY, E.V., CARRUTHERS, C., SUNTZEFF, V.: Influence of age on copper and zinc content in the epidermis of mice undergoing carcinogenesis with methylcholanthrene and a note on the role of calcium. *J. Nat. Cancer Inst.* 8, 209-213 (1948)
- 29) CRABTREE, H.G.: Influence of solvent on the rate of induction of epithelial skin tumours in mice. *J. Path. Bact.* 51, 299-302 (1940)
- 30) DOERMER, P., OEHLERT, W.: Untersuchungen über die unterschiedliche Wirkung von Cocarcinogenen und Carcinogenen auf die Epidermis der Maus. *Beitr. path. Anat. allg. Path.* 129, 307-330 (1963-64)

- 31) DOERMER, P., TULINIUS, H., OEHLERT, W.: Untersuchungen über die Generationszeit und Mitosedauer von Zellen der hyperplastischen Epidermis und des Plattenepithelcarcinoms der Maus nach Methylcholanthrenpinselung. Zschr. Kreislaufforschung 66, 2-28 (1964)
- 32) DOLL, R., HILL, A.P.: Smoking and carcinoma of the lung: preliminary report. Brit. Med. J. 2, 739-748 (1950)
- 33) DOLL, R., HILL, A.P.: A study of the aetiology of carcinoma of the lung. Brit. Med. J. 2, 1271-1286 (1952)
- 34) DONIACH, J.: A comparison of the photodynamic activity of some carcinogenic with noncarcinogenic compounds. Brit. J. of Exp. Path. 20, 227-234 (1939)
- 35) DONTENWILL, W.: Experimentelle Untersuchungen zur Genese des Lungencarcinoms. Arzneimittelforschung 14, 774-780 (1964)
- 36) DRUCKREY, H.: Die Auslösung einer Riesenform bei Seeigelkeimen durch das krebserregende 3,4 Benzpyren. Naturwissenschaften 30, 734-735 (1942)
- 37) DRUCKREY, H., SCHMÄL, D., REUTHNER, H., MUTH, F.: Vergleichende Prüfung von Tabakrauchkondensaten, Benzpyren und Tabakextrakt auf carcinogene Wirkung an Ratten. Naturwissenschaften 24, 605-606 (1960)
- 38) DRY, F.W.: The coat of mouse (mus musculus) J. Genetics 16, 287-340 (1926)
- 39) VAN DUUREN, B.L.: Some aspects of the chemistry of tobacco smoke. Tobacco and Health p. 33-47 (1962) Springfield, Illinois, USA
- 40) EARLE, W.R.: Production of malignancy in vitro. J. Nat. Cancer Inst. Vol. 4, No. 2, 131-248 (1943)

- 41) ELSON, L.A., HADDOW, A.: The inhibitory action of 1,2,5,6 Dibenanthracene on the growth of the Walker carcinoma 256 in rats maintained on high and low protein diets. Brit. J. Cancer 1, 97-101 (1947)
- 42) ELSON, L.A., WARREN, F.L.: The relation between growth inhibition, toxicity and protein metabolism in rats treated with 1,2,5,6Dibenanthracene. Brit. J. Cancer 1, 86-97 (1947)
- 43) EVENSEN, A.: Effects of carcinogens on cell proliferation. in IVERSEN, O.H., EVENSEN, A. Experimental skin carcinogenesis in mice. Norw. Monographs on Medical Science. (1962)
- 44) FIRKET, H.: Recherches sur la synthèse des acides desoxyribonucléique et la préparation à la mitose dans des cellules cultivées "in vitro" (Etude cytophotométrique et autoradiographique). Arch. Biol. 69, 1- (1959)
- 45) FUNDER, S.: The effect of long exposure to carcinogenics and other substances on the morphology and growth of escherichia coli, serratia phymuthicum and saccharomyces cerevisae. Acta path. microbiol. scand. 40, 25-38 (1957)
- 46) GOLDSTEIN, S.: A microbiological test for carcinogenic hydrocarbons. Science 86, 176-177 (1937)
- 47) GRAHAM, E.A., CRONINGER, A.B., WYNDER, E.L.: Experimental production of carcinoma with cigarette tar III. Occurrence of cancer after prolonged latent period following application of tar. Cancer 10, 431-435 (1957)
- 48) GRIMMER, G.: Eine Methode zur Bestimmung von 3,4-Benzpyrén in Tabakrauchkondensaten. Beitr. z. Tabakforschung 1, 107-116 (1961)
- 49) GSELL, H.: Krankheiten durch Tabakrauchen. Zschr. f. Präventivmedizin 6, 366-395 (1961)

- 50) GUERIN, M., et CUZIN, J.L.: Tests cutanés chez la souris pour déterminer l'activité carcinogènes des goudrons de fumée de cigarettes. Bull. Ass. franc. Cancer 48, 111-121 (1961)
- 51) HADDOW, A.: The influence of carcinogenic compounds and related substances on the rate of growth of spontaneous tumors of the mouse. J. Path. Bact. 47, 567-579 (1938)
- 52) HADDOW, A., ROBINSON, A.M.: The influence of various polycyclic hydrocarbons on the rate of growth of transplantable tumours. Proc. Roy. Soc. London B 122, 442-477 (1937)
- 53) HADDOW, A., SCOTT, C.M., SCOTT, I.D.: The influence of certain carcinogenic and other hydrocarbons on body growth in the rat. Proc. Roy. Soc. London B 122, 477-507 (1937)
- 54) HAMMOND, E.C., HORN, D.: Smoking and death rates report on forty four months of follow up of 187783 men. I. Total Mortality. J. Am. Med. Ass. 166, No. 10, 1159-1172 (1958)
- 55) HAMMOND, E.C., HORN, D.: Smoking and death rates. report on forty-four months of follow up of 187783 men. II. death rates by cause. J. Am. Med. Ass. 166, No. 11, 1299-1308 (1958)
- 56) HAMMOND, E.C., HORN, D.: The relationship between human smoking habits and death rates. J. Am. Med. Ass. 155, No. 15, 1316-1328 (1954)
- 57) HAMPERL, H.: Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie. S. 580, S. 254 (1960)
- 58) HAMPERL, H.: Über die chronische Colchicinwirkung. Klinik und Praxis 1, 186-187 (1946)
- 59) HAMPERL, H., GRAFFI, A., LANGER, B.: Zur Kenntnis der Wirkungsweise des Benzpyrens auf die Mäusehaut. Zschr. f. Krebsforschung 53, 133-184 (1943)

- 60) HOEPKE, H.: Hemmung des Wachstums von Walker Tumoren der Ratte durch Thymus-Trocken-Zellen. Zschr. mikro. anat. Forsch. 64, 159-167 (1958)
- 61) HÜBNER, E.: Zur Bewertung des Talgdrüsenchwundtestes. Diss. Hamburg (1963)
- 62) IVERSEN, O.H., EVENSEN, A.: Experimental skin carcinogenesis in mice. Norw. Monographs on Medical Science (1962)
- 63) KENNAWAY, E.L.: Experiments on cancerproducing substances. Brit. Med. J. 2, 1-4 (1925)
- 64) KLEIN, M.: Induction of skin tumors in the mouse with minute doses of 9,10Dimethyl-1,1benzanthracene alone or with croton oil. Cancer Res. 16, 123-127 (1956)
- 65) KLEIN, U.E.: Methoden zur Schnelltestung cancerogener Substanzen. Beitr. z. Tabakforschung 1, 55-62 (1962)
- 66) KOBURG, E., SCHULTZE, B.: Autoradiographische Untersuchungen mit H^3 Thymidin über die Dauer der DNS-Synthese der Ruhephase und der Mitose bei proliferierenden Systemen wie den Epithelien des Darms, des Ösophagus und der Cornea der Maus. Verh. Dtsch. Ges. Path. 45 Tag. 103- (1961)
- 67) KOSAK, A.I.: Preliminary studies on the chemical fractionation of tobacco tar. Bull. New York Acad. Med. 32, 76- (1956)
- 68) KOTIN, P., FALK, H.L.: Atmospheric factors in pathogenesis of lung cancer. Adv. Cancer Res. 7, 475-509 (1963)
- 69) KRACHT, J., HÜBNER, E.: Modifikation der biologischen Aktivität von Zigarettenrauchkondensaten im Talgdrüsenchwundtest. Naturwissensch. 49, 330-331 (1962)
- 70) KRACHT, J., KLEIN, U.E., BAGHIRZADE, M.: Erfahrungen mit dem Talgdrüsenchwundtest. Verh. Dtsch. Ges. Path. 45 Tag. 170-174 (1961)

- 71) LASNITZKI, I.: Observations on the effects of condensats from cigarettes smoke on human foetal lung in vitro. Brit. J. Cancer 12, 547-552 (1958)
- 72) LASNITZKI, I.: The effect of estrone alone and combined with 20Methylcholanthrene on mouse prostrate gland grown in vitro. Cancer Res. 14, 632-639 (1954)
- 73) LATARGET, R., ELIAS, C., BUU HOI, N.P.: Production d'une mutation bactérienne par des cancérigènes hydro-solubles. Comptes Rendus des Séances de la Soc. de Biol. 143, 776-778 (1949)
- 74) LAZAR, P., LIBERMANN, C., CHOUOULINKOV, I., GUERIN, M.: Test sur la peau de souris pour la détermination des activité carcinogènes: Mise au point methodologique. Bull. du Cancer 50, 567-577 (1963)
- 75) LETTRE, H., JAHN, A.: Zur Bildung aromatischer Kohlenwasserstoffe während des Rauchprozesses. Naturwissenschaften 42, 210 (1955)
- 76) LINDSEY, A.J.: Some observations upon chemistry of tobacco smoke. Tobacco and Health p. 21-32 (1962) Springfield, Illinois, USA
- 77) MAURER, W., KOBURG, E.: Autoradiographische Untersuchungen mit H^3 Thymidin über den zeitlichen Ablauf der DNS-Synthese bei den Epithelien des Darms und bei anderen Zellarten der Maus. Verh. Deutsch. Ges. Path. 45. Tag. 108-112 (1961)
- 78) MILLER, E.C.: Studies on the formation of protein bound derivatives of 3,4 Benzpyrene in the epidermal fraction of mouse skin. Cancer Res. 11, 100-108 (1951)
- 79) MILLER, E.A., MILLER, I.A., BROWN, R.R.: On the inhibitory action of certain polycycle hydrocarbons on azo dye carcinogenesis. Cancer Res. 12, 282-283 (1952)
- 80) MOCH, P.: Modifikationen und Anwendungsbeispiele des Talgdrüsenschwundtestes. Diss. Hamburg (1964)

- 81) MONTAGNA, W.: The cytologie of mammalian epidermis and sebaceous glands. *Internat. Rev. Cytol.* 1, 265 (1952)
- 82) MORI, K., ICHII, S., SIGETA, Y.: Inhibition of experimental production of liver cancer by tobacco tar. *Gann* 47, 91-103 (1956)
- 83) MORTON, J.J., MIDER, G.B., LUCE-CLOUSEN, E.M., MAHONEY, E.B.: The effect of visible light on the development in mice of skin tumours and leukemia induced by carcinogens. *Cancer Res.* 11, 559-561 (1951)
- 34) MORTON, L., LEVIN, M.D., GOLDSTEIN, H., GERHARDT, P.R.: Cancer and tobacco smoking. *J. Am. Med. Ass.* 143, No. 4, 336-338 (1950)
- 85) MOTTRAM, J.C.: 3,4-Benzpyren, Paramecium and the production of tumours. *Nature* 145, 184-185 (1940)
- 86) MULLER, F.M.: Tabakmißbrauch und Lungencarcinom. *Zschr. Krebsforschung* 49, 57-85 (1939)
- 87) NEUKOMM, S.: Un test sensible et ultra-rapide du pouvoir cancérigène de certaines substances chimiques. *Oncologia* 10, 107-119 (1957)
- 88) NIKLAS, A., OEHLERT, W.: Quantitative Bestimmung des Eiweißumsatzes mit Autoradiographie und sein Verhältnis zur Menge RNS. *Beitr. Path. Anat.* 116, 91 (1956)
- 89) NORDEN, G.: The rate of appearance, Metabolism and disappearance of 3,4-Benzpyrene in the epithelium of mouse skin. *Acta path. microbiol. scand. Suppl.* 96 (1953)
- 90) OEHLERT, W., COTE, J., BÜCHNER, F.: Autoradiographische Untersuchungen zur Cancerisierung der Epidermiszelle der Mäusehaut nach Methylcholanthrenpinselung. *Beitr. Path. Anat.* 125, 280-286 (1961)

- 91) ORRIS, L., van DUUREN, B.L., KOSAK, A.L., NELSON, N., SCHMITT, F.L.: The carcinogenicity for mouse skin and the aromatic hydrocarbon content of cigarette smoke condensates. J. Nat. Cancer Inst. 21, 557-561 (1958)
- 92) OTTO, H.: Die Bewertung des metaplastischen Bronchial-epithelregenerates. Beitr. Path. Anat. 117, 397-424 (1957)
- 93) PALETTA, F.X., COWDRY, E.V., LISCHER, C.E.: Compari-
sion of methylcholanthrene hyperplastic epidermis with
benigne hyperplastic epidermis in healing wounds.
Cancer Res. 1, 942-952 (1941)
- 94) ORTIC PICON, J.M.: Über Zellteilungsfrequenz und Zell-
teilungsrythmus in der Epidermis der Maus. Zschr.
Krebsforschung 19, 488-509 (1933)
- 95) PLAUT, W., MAZIA, D.: The distribution of newly syn-
thesized DNA in mitotic division. J. Biophys. Biochem.
Cytol. 2, 573-588 (1956)
- 96) PULLINGER, B.D.: The first effects on mouse skin of
some polycyclic hydrocarbons. J. Path. Bact. 50, 463-
471 (1940)
- 97) QUASTLER, H., SHERMAN, F.G.: Cell population kinetics
in the intestinal epithelium of the mouse. Exp. Cell
Res. 17, 420-438 (1959)
- 98) RAREI, B., GUMMEL, H.: Beeinflussung des Tumorwachs-
tums durch 3,4Benzpyren, insbesondere durch die cho-
lestenonsulfosaure Benzpyrenlösung. Zschr. Krebs-
forsch. 48, 355-365 (1938-39)
- 99) REICHARD, P., ESTBORN, B.: Utilisation of desoxyribo-
side in the synthesis of polynucleotides. J. Biol.
Chem. 188, 839-840 (1951)
- 100) ROCHUS, W.: Grundsätzliche Überlegungen zur chemi-
schen Zusammensetzung des Tabakrauchs und seiner Ab-
scheidungsprodukte. Beitr. Tabakforsch. 2, 155-164
(1962)

- 101) ROFFO, A.H.: Durch Tabak beim Kaninchen entwickeltes Carcinom. Zschr. Krebsforsch. 33, 321-332 (1931)
- 102) ROFFO, A.H.: Krebserzeugendes Benzpyren, gewonnen aus Tabakteer. Zschr. Krebsforsch. 49, 588-597 (1940)
- 103) RUMSFELD, H.W., MILLER, W.L., BAUMANN, C.A.: A sex difference in the development of liver tumours in rats fed 3-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene or 4-Fluoro-4-dimethylaminoazobenzene. Cancer Res. 11, 814-819 (1951)
- 104) SALL, R.D., SHEAR, M.J.: Studies in carcinogenesis XII Effect of the basic fraction of creosote oil on the production of tumours in mice by chemical carcinogens. J. Nation. Cancer Inst. 1, 45 (1940)
- 105) SCHÄR, M.: Ursache und Wirkung, Zschr. f. Präventivmedizin 6, 339-348 (1961)
- 106) SCHERR, M.G., FISHMANN, M., WEAVER, R.M.: The mutagenicity of some carcinogenic compounds for escherichia coli. Genetics 39, 141-149 (1954)
- 107) SCHIEVELBEIN, M.: Nikotin, Rauchen und Organismus. Beitr. Tabakforsch. 2, 258-264 (1962)
- 108) SCHREK, R., BAKER, L.A., BALLARD, G.P., DOLGOFF, S.: Tobaccosmoking as an etiologic factor in disease I Cancer. Cancer Res. 10, 49-58 (1950)
- 109) SCHULTZE, B., OEHLERT, W.: Autoradiographic investigation of incorporation of H³thymidin into cells of the rat and mouse. Science 132, 737 (1960)
- 110) SEELKOPF, C., RICKEN, W., DHOM, G.: Untersuchung über die krebserzeugenden Eigenschaften des Zigaretten-teers. Zschr. Krebsforsch. 65, 241-249 (1963)
- 111) SETÄLA, K., LUNDBOM, S., HOLSTI, P.: Über geschwulst-artige Veränderungen beim Schleimpilz Physarum polycephalum, hervorgerufen durch Carcinogene sowie durch nichtionisierbare oberflächenaktive Tumorauslösesubstanzen. Zschr. Krebsforsch. 68, 245-269 (1958)

- 112) SIMPSON, W.L., CARRUTHERS, C., CRAMER, W.: Loss of carcinogenic activity when Methylcholanthrene is dissolved in anhydrous lanolin. Cancer Res. 5, 1-14 (1945)
- 113) SIMPSON, W.L., CRAMER, W.: Sebaceous glands and experimental skin carcinogenesis in mice. Cancer Res. 3, 515-518 (1943)
- 114) SIMPSON, W.L., CRAMER, W.: Sensitization of skin by carcinogenically inactive Methylcholanthrene to subsequent carcinogenesis. Cancer Res. 5, 5-10 (1945)
- 115) SKJAEGGESTADT, Ø.: Experimental epidermal hyperplasia in mice relation to carcinogenesis. Norw. Monographs on Med. Science (1964)
- 116) SPENCER, R.R., MELROY, M.B.: Effect of carcinogens on small freelifving organisms: I Eberthella Typhi J. Natio. Cancer Inst.: 1, 129-134 (1940)
- 117) STOWELL, R.E., CRAMER, W.: The effect of solvents in Methylcholanthrene epidermal carcinogenesis: A comparison of Benzene and Acetone. Cancer Res. 2, 193-196 (1942)
- 118) SUNTZEFF, V., CARRUTHERS, C., COWDRY, E.V.: The role of sebaceous glands and hair follicles in epidermal carcinogenesis. Cancer Res. 7, 439-443 (1947)
- 119) SUNTZEFF, V., COWDRY, E.V., CRONINGER, A.: Microscopic visualization of the degeneration of sebaceous glands caused by carcinogens. Cancer Res. 15, 637-640 (1955)
- 120) SUNTZEFF, V., COWDRY, E.V., CRONINGER, A.: Microscopic visualization of sebaceous glands in sections parallel to the surface. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 2, 50 (1955)

- 121) SUNTZEFF, V., CRONINGER, A., WYNDER, E.L., DOWDRI, E.V., GRAHAM, E.A.: Use of sebaceous-gland test of primary cigarette tar fraction and of certain non-carcinogenic polycyclic hydrocarbons. *Cancer* 10, 250-254 (1957)
- 122) TAYLOR, I.H.: Autoradiography with tritium labeled substances. *Adv. Biol. Med. Phys.* 7, 107 (1960)
- 123) Tobacco Res. Council London W. I (1965) The Constituents of Tobacco Smoke: An Annotated Bibliography.
- 124) VENEMA, G.: The influence of substances extracted from cigarette smoke on mitotic processes in *Allium cepa* Chromosoma 10, 679-685 (1959)
- 125) WHITE, I., WHITE, A.: Inhibition of growth of rat by oral administration of Methylcholanthrene. Effects of dietary Cystine and Methionine supplements. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 39, 527-529 (1938)
- 126) WIEDEMANN, H.D.: Quantitative experimentelle Untersuchungen über initiale Epidermishyperplasie und Talgdrüsenchwund durch carcinogene Noxen. *Diss. Hamburg* (1964)
- 127) WOLF, I.: *Lehre von der Krebskrankheit Band II* (1911) G. Fischer, Jena.
- 128) WYNDER, E.L.: Experimental production of carcinoma with cigarette tar. *Bull. New York Acad. Med.* 32, 76 (1956)
- 129) WYNDER, E.L., HOFFMANN, D.: The role of skin neoplasia in tobacco carcinogenesis. *Tobacco and Health*. p. 61-71. James and Rosenthal, Eds., Springfield, Illinois, USA (1962)
- 130) WYNDER, E.L., HOFFMANN, D.: Present status of laboratory studies on tobacco carcinogenesis. *Acta path. microbiol. scand.* 52, 119-132 (1961)

- 131) WYNDER, E.L., HOFFMANN, D.: Bioassay on the carcinogenicity of tobacco smoke condensates and air pollutants. Proc. Am. Ass. Cancer Res. 4, 73 (1963)
- 132) WYNDER, E.L., HOFFMANN, D.: Experimental tobacco carcinogenesis. Adv. Cancer Res. 8, 250-453 (1964)
- 133) WYNDER, E.L., HOFFMANN, D.: A study of tobacco carcinogenesis: VII, The role of higher polycyclic hydrocarbons. Cancer 12, 1079-1086 (1959)
- 134) WYNDER, E.L., HOFFMANN, D.: The carcinogenicity of Benzofluoranthenes. Cancer 12, 1194-1199 (1959)
- 135) WYNDER, E.L., HOFFMANN, D.: Studies with the gaseous and particulate phase of tobacco smokes. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 3, 373 (1959-62)
- 136) WYNDER, E.L., HOFFMANN, D.: A study of tobacco carcinogenesis: VIII. The role of acidic fractions as promoters. Cancer 14, 1306-1315 (1961)
- 137) WYNDER, E.L., GRAHAM, E.A.: Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma. J. Am. Med. Ass. 143, No. 4, 329-336 (1950)
- 138) WYNDER, E.L., GRAHAM, E.A., CRONINGER, A.B.: Experimental production of carcinoma with cigarette tar. Cancer Res. 13, 655-664 (1953)
- 139) WYNDER, E.L., LEMON, F.R., BROSS, I.J.: Cancer and coronary artery disease among seventh day adventist. Cancer 12, 1016-1028 (1959)
- 140) WYNDER, E.L., WRIGHT, G.: A study of tobacco carcinogenesis: I. The primary fractions. Cancer 10, 255-271 (1957)
- 141) WYNDER, E.L., WRIGHT, G., LAM, I.: A study of tobacco carcinogenesis: V. The role of pyrolysis. Cancer 11, 1140-1148 (1958)

LEBENS LAUF:

Als Sohn des Kaufmannes Hermann Féaux de Lacroix und seiner Ehefrau Katharina geb. Zobel wurde ich am 7.8.39 in Hamburg geboren. Im Herbst 1945 wurde ich in die Volksschule Hamburg Duvenstedt eingeschult. Von 1951 bis 1957 besuchte ich die Oberschule Hamburg Volksdorf. Dann wurde ich auf das Institut auf dem Rosenberg, St. Gallen, Schweiz umgeschult und bestand dort im Frühjahr 1959 die Reifeprüfung. Bis 1960 leistete ich meinen Wehrdienst ab. Im Frühjahr 1960 begann ich mein Medizinstudium in Marburg, Lahn. Dort bestand ich 1961 das Vorphysikum und 1962 das Physikum. Nach dem Physikum studierte ich zwei Semester im Ausland, davon eines in Innsbruck, das andere in Paris. Ich setzte mein Studium in München fort und bestand dort das Staatsexamen am 7.2.66. Ich arbeitete vier Monate auf der Internen Abteilung des Krankenhauses am Biederstein und fünf Monate auf der Chirurgischen Abteilung des Krankenhauses rechts der Isar.

